

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-207827

(43)Date of publication of application : 20.08.1993

---

(51)Int.Cl.

A01H 1/00  
C12N 5/10  
C12N 13/00  
C12N 15/87

---

(21)Application number : 03-307168

(71)Applicant : SAPPORO BREWERIES LTD

(22)Date of filing : 28.10.1991

(72)Inventor : KANEKO TAKASHI  
ITO KAZUTOSHI

---

(30)Priority

Priority number : 40229358    Priority date : 01.11.1990    Priority country : JP

---

### (54) PRODUCTION OF TRANSFORMED PLANT

#### (57)Abstract:

PURPOSE: To remarkably reduce the transforming operation by transducing a genetic substance through holes formed with laser pulses into a pollinical cell in a stage just before starting the division or during the initial division in a process for culturing an anther of the pollinical cell enclosed in the anther of a gramineous plant.

CONSTITUTION: In a process for culturing an anther in the mid uninucleate stage microspores enclosed in the anther of a gramineous plant, a genetic substance is transduced through holes formed with laser pulses into the pollinical cell in a stage just before starting the division or during the initial division and the genetic information on the genetic substance is expressed to afford the objective transformed gramineous plant. Furthermore, barley is preferred as the gramineous plant.

---

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of  
rejection]

[Kind of final disposal of application other than  
the examiner's decision of rejection or  
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

\* NOTICES \*

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The manufacture approach of the Poaceae transformation vegetation characterized by making the gene matter introduce into the pollen cell concerned through the hole formed of the laser pulse , and making it discover the gene information of the gene matter concerned in the phase under initial fission in the anther culture process of the pollen cell in the middle of 1 nucleus term by which endocyst be carried out to the anther of a grass just before starting fission .

[Claim 2] The manufacture approach of the Poaceae transformation vegetation according to claim 1 that grasses are wheat.

[Claim 3] The manufacture approach of the Poaceae transformation vegetation according to claim 2 that wheat is barleies.

[Claim 4] The grass transformation approach characterized by making the gene matter introduce into the pollen cell concerned in the phase under initial fission through the hole formed of the laser pulse in the anther culture process of the pollen cell in the middle of 1 nucleus term by which endocyst is carried out to the anther of a grass just before starting fission.

[Claim 5] In the anther culture process of the pollen cell in the middle of 1 nucleus term by which endocyst is carried out to the anther of a grass, just before starting fission, in the phase under initial fission The gene matter is made to introduce into the pollen cell concerned through the hole formed of the laser pulse. The manufacture approach of the Poaceae transformation vegetation characterized by choosing the cell which discovers the gene information of the gene matter concerned, cultivating this selected cell by the callus inducer medium, making a callus and/or an embryoid body form, planting in a redifferentiation culture medium after that, inheriting, obtaining a plant body, and checking a transformation.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the manufacture approach of the Poaceae transformation vegetation, and the grass transformation approach.

[0002]

[Description of the Prior Art] Although the transgenics approach using Agrobacterium is established as a vegetable transformation method, Agrobacterium cannot be infected with the Poaceae vegetation containing a barley, but other approaches are tried.

[0003] The approach of direct installation of Vector DNA is examined as those approaches. for example, the electroporation method and party Kurgan -- law, the polyethylene-glycol method, or a microinjection method The approach of using and carrying out a transformation, i.e., corn, "Nature, 319 volume, and 791 (1986)", A rice "Mol.Gen.Genet., 204 volume, and 204 (1986)", It is reported by wheat "Mol.Gen.Genet., 199 volume, and 178 (1985)" and grass "Mol, Gen.Genet., 199 volume, and 178 (1985)" that the transgenics to a plant cell is possible.

[0004] However, by the approaches of importing a gene into a cell physically, such as the party Kurgan method and a microinjection method, there are problems, such as lowness of processing effectiveness and generating of chimera transformation vegetation.

[0005] Furthermore, although the approach through protoplasts, such as a manufacturing method "JP,1-181791,A", the polyethylene-glycol method, etc. of transformation vegetation using the transgenics system to a grass by electroporation, is reported, the system from a protoplast to a plant body is not established with many wheat. Moreover, many selection culture and a long period are required for preparation of a protoplast, and further, even if protoplast culture is the same crops, the present condition is that it is applicable only to the form which was excellent in some culture properties, and a network.

[0006] now as an approach of carrying out a transformation by the laser pulse, it uses for the transformation of an animal cell -- having -- \*\*\*\* -- the use to an experiment preliminary about a plant tissue and its cell -- stopping -- "Plant Cell Tissue and Organ Culture, such as Weber, 12 volumes, and 219 (1988)" and the experiment about an organelle -- "-- the [ West Germany patent application ] -- although used also in 3707111A official report", carrying out the transformation of the vegetable pollen by the above-mentioned approach is not known. Moreover, the transformant from which "JP,2-9378,A" to which the manufacturing method of the transformation vegetation using the transgenics system by the laser to a corn germ is reported is obtained by this approach is a chimera, and the method of obtaining the transformant of a gay object with wheat, such as a barley, is not yet established. It cannot accomplish, although various transformations of a plant body are tried like \*\*\*\*, and there is a long strong request in a monocotyledonous plant, especially a grass.

[0007]

[Means for Solving the Problem] That the above-mentioned technical problem should be conquered, as a result of repeating examination wholeheartedly, this invention person etc. introduces a foreign gene into

the pollen of a grass efficiently, and came to complete a header and this invention for the approach of manufacturing the grass by which the transformation was carried out.

[0008] Namely, this invention is a phase under initial fission, just before starting fission in the anther culture process of the pollen cell in the middle of 1 nucleus term by which endocyst is carried out to the anther of a grass. The gene matter is made to introduce into the pollen cell concerned through the hole formed of the laser pulse. In the anther culture process of the pollen cell in the middle of 1 nucleus term by which endocyst is carried out to the anther of a grass at the manufacture approach list of the Poaceae transformation vegetation characterized by making the gene information of the gene matter concerned discover, just before starting fission, in the phase under initial fission The grass transformation approach characterized by making the gene matter introduce into the pollen cell concerned through the hole formed of the laser pulse is offered. Hereafter, this invention is explained to a detail.

[0009] In the anther culture process of the pollen cell in the middle of 1 nucleus term by which endocyst is usually carried out to an anther, the approach of this invention is a phase under initial fission, just before starting fission, and it can be performed the solution containing the gene matter which has genetic information to introduce a suitable pollen cell, and by making it suspend in a water solution typically. Subsequently, double the focus of laser equipment with one of the pollen cells concerned, and irradiate laser, a hole is made to form into a cell wall, and the gene matter is introduced into intracellular through this hole. Cultivate this cell by the callus inducer medium, and a callus and/or an embryoid body are made to be able to form, and it can plant in a redifferentiation culture medium after that, and can inherit, a transformation can be checked, and transformation vegetation can be obtained.

[0010] The approach of cultivating a suitable pollen cell in the phase under initial fission just before it cultivates the anther of a grass by the callus inducer medium and the pollen in the middle of 1 nucleus term by which endocyst is carried out starts fission as a cultured cell An anther An alteration MS culture medium "Carlsberg Res.Comm.52 volume and 393 (1987)", A FHG culture medium "XIX Stadler Genetics Symp.213 (1989), such as Kasha", Clapham I, II, and III Culture medium "Z.Pflanzenzucht, 69 volumes, and 142 (1973)", It cultivates in the culture medium selected based on the property of the anther cultivated from culture media, such as culture media "Z.Pflanzenzucht, 77 volumes, and 198 (1976)", such as Foroughi-Weir, and a strange method culture medium of those culture media. Although culture temperature is based on the anther to cultivate, 22-28 degrees C is usually near 25 degree C preferably, and it is 5.8 preferably, and although pH at the time of culture depends incubation period on 5.6-6.0, and the anther to cultivate, it is usually for zero - 14 days. A pollen cell is divided, and the lasing should be carried out when the capacity which reproduces DNA in a callus inducer medium is acquired (i.e., when a pollen cell changes to cytoplasm Rich's cell in gestalt). Generally, a pollen cell changes to the cell which was suitable within two weeks at the lasing.

[0011] Moreover, the pollen cell obtained by approaches "Plant Cell Reports, 9 volume, and 59 (1990)", such as Ziauddin, may be used. A rice, corn, and wheat are mentioned, as wheat, a barley, wheat, rye wheat, OTSUMUGI, rye wheat, etc. are mentioned, and, as for the grass used here, Dissa, Igri, TRUMPF, CARINA, two article of \*\*\*\*\* etc., etc. are mentioned as a barley. What is necessary is just to extract an anther according to a conventional method from these vegetation. Moreover, the thing in the middle of 1 nucleus term by which the pollen cell concerned used was isolated from the anther is mentioned.

[0012] The gene matter which has genetic information makes the genetic information stabilize by the grass. It is controlled to discover the genetic information and the plasmid which specifically functions by the grass is mentioned. For example, the promotor of the cauliflower mosaic virus origin of CaMV35S and CaMV19S grade as a promotor which functions by the grass, PR protein promotor, ADH-1 promotor, etc. as a terminator Terminators, such as CaMV35S, CaMV19S, and NOS, It has foreign genes, such as transposon genes, such as storage protein genes, such as insect resistance genes, such as a desired herbicide resistance gene, BT toxin, and protease inhibitor, a virus resistance gene, a zein, and a glutenin, and Ac, Da, etc. as a transformation property. Furthermore, you may have a drug resistance gene as an initial selective marker.

[0013] It has the about 10-20,000microg [ /ml ] gene which wishes to introduce the solution containing

the gene matter concerned into a cell, other components, the inactive salts for specifically promoting equilibration or hypertonicity-izing of exact osmotic pressure, cell nutriment, or other additives. If it illustrates more concretely, the gene suspension containing 9 - 15% of mannitol can be mentioned.

[0014] Next, although double the focus of laser equipment with one of the pollen cells concerned, and irradiate laser, a hole is made to form into a cell wall and the gene matter is introduced into intracellular through this hole, although the dimension of a hole may be fluctuated, it must not be not much large as compared with the dimension of a cell. The hole which usually specifically has the diameter of 5-500nm is made to form. The impression time amount of a pulse is usually 5 - 20 nanoseconds, and is 10 - 15 nanoseconds preferably. Pulse energy is usually adjusted to the range of a 0.1-10micro joule ( $\mu$ J). The equipment of the arbitration which can concentrate laser on a minute focus moderately in principle can be used for the laser equipment used. Suitably, it is already the laser of a mammalian cell. Hitachi Hitachi laser marketed by the microinjection as available equipment Cel A processor is mentioned.

[0015] After performing the lasing, sufficient time amount for making the gene matter spread and invade into the pollen cell after punching from the solution and the pollen cell concerned are incubated in the solution containing the gene matter concerned. Incubation time amount is usually 5 seconds - 2 hours, and the temperature of an incubation is usually 0-28 degrees C.

[0016] After performing the lasing and incubation which were performed by carrying out like \*\*\*\*, the cell guided the obtained pollen cell or from now on is cultivated, and a plant body is made to produce. as the desirable mode of this invention -- Olsen etc. -- approaches "Plant Cell Reports, 9 volume, and 59 (1990)", such as an approach "Carlsberg Res.Comm.52 volume and 393 (1987)" and Ziauddin, are mentioned. Furthermore, use of a nurse cell can be mentioned as a desirable mode.

[0017]

[Example] Although an example is given to below and this invention is explained to it, these do not limit this invention at all.

Example 1 barley cv Dissa You make it grow in 10 degree-C-dark -8 hours after seeding for 12 degree-C-\*\*-16 hours, and it is the middle (mid uninucleate stage microspores) of a pollen 1 nucleus term. An anther is planted in an alteration MS+Ficol culture medium, an anther is cleft with a pincette and a spoon after 25-degree culture [ -two-week ], and it is begun in a DNA solution to pass a pollen cell. 10-20 anthers are taken in 1ml solution, enriching recovery of the cultured cell just before starting fission except for a callus and impurity by 96 micrometerphi nylon mesh is carried out to 20-100microl by centrifugal separation (1000rpmx5min), and it considers as a lasing sample.

[0018] The DNA solution to be used is Okada. BamHI of the +15% mannitol +pBI221of solutions [Toyobo Co., Ltd. selling ]10microg/ml+pSBG102(Hmr) [above pBI221, and PstI It is thing ] 10microg/ml+Calf Thymus DNA 50microg/ml which transposed the beta-glucuronidase structural gene surrounded by the site to the hygromycin B phosphotransferase structural gene "Gene, 25 volumes, and 179 (1983)."

[0019] This drop is placed on a petri dish, in order to prevent desiccation, the piece of 1% agarose of 5mm angle is carried, and a petri dish is covered, and it winds with a film, and is the Hitachi laser. Cel It set to the processor. This sample contains the cell lump which started the pollen cell, the single cell, and fission which were generated. Cytoplasm Rich's generating single cell is chosen and it is 0.4microJ. Laser pulse punching was carried out with energy.

[0020] The sample after processing was diluted with the alteration MS liquid medium of 100-200microl, and carried out stationary culture at 25 degrees C. The equivalent culture medium (hygromycin B content) was added after two weeks. what became the callus of the diameter of several mm -- installation of a GUS enzyme -- the characteristic was investigated. Consequently, about 1/of GUS activity was accepted at a rate of 16. The measuring method of GUS activity is shown below.

[0021] The formula X-glu solution (5-BUROMO-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid) storage solvent of the stain solution for approach gas analyses of GUS assay [20mg / 1 X-gluDMF] 5mg X-glu in deoxydized DMF (dimethyl formamide) \*\*solute in 5ml 50mM KP.buffer [(potassium phosphoric-acid buffer) pH7.0 final concentration/ml[ of 1mg ]]

[0022] GUS dissolution buffer 50mM KP.buf pH7.0+10mM EDTA+0.1%Triton X 100+0.1%

Sarkosyl+10mM 2-Mercaptoethanol [0023] preparation of a cell -- what is necessary is just to dip in liquid as it is, when dyeing a small colony and the front face of an organization When making it react quantitatively or correctly, a little GUS dissolution buffer is added, printed and crushed in an organization, and a substrate is added. In 1mm callus, it is good with GUS dissolution buffer 20microl and 100micro of X-glu solutions l.

[0024] It is made to grow in 10 degree-C-dark -8 hours after example 2 barley Igri seeding for 12 degree-C-\*\*-16 hours, and is the middle (mid uninucleate stage microspores) of a pollen 1 nucleus term. The anther was obtained. This anther is planted in an alteration MS+Ficol culture medium, an anther is cleft with a pincette and a spoon after two-week culture at 25 degrees C, and it is begun in a DNA solution subsequently, to pass a pollen cell. 10-20 anthers are taken in 1ml solution, enriching recovery of the cultured cell under initial fission is carried out to 20-100microl according to centrifugal separation (1000rpmx5min) except for a callus and impurity by 96 micrometerphi nylon mesh, and it is laser. It considered as the pulse processing sample.

[0025] The DNA solution to be used is Okada. BamHI of the +15% mannitol +pBI221of solutions [Toyobo Co., Ltd. selling ]10microg/ml+pSBG102(Hmr) [above pBI221, and PstI It is thing ] 10microg/ml+Calf Thymus DNA 50microg/ml which transposed the beta-glucuronidase structural gene surrounded by the site to the hygromycin B phosphotransferase structural gene "Gene, 25 volumes, and 179 (1983)."

[0026] This drop is placed on a petri dish, in order to prevent desiccation, the piece of 1% agarose of 5mm angle is carried, and a petri dish is covered, and it winds with a film, and is the Hitachi laser. Cel It set to the processor. About this sample, it is 0.4microJ. Laser punching is automatically carried out with energy.

[0027] The sample after processing was diluted with the alteration MS liquid medium of 500microl, and carried out stationary culture at 25 degrees C. The equivalent hygromycin selection culture medium (20microg [/ml ] hygromycin B) was added after two weeks. what became the callus of the diameter of several mm -- installation of a GUS enzyme or hygromycin tolerance -- the characteristic was investigated. Consequently, hygromycin tolerance was accepted at a rate of the abbreviation 1/2000 of a processing cell.

[0028] The leaf primordium equivalent to the redifferentiation cotyledon of the redifferentiation barley transformation vegetation to a plant body was transplanted to the rooting culture medium except hormone, by cultivating on these conditions, development of a root and growth of a terrestrial part were urged and the perfect plant body redifferentiated in about one month. Nucleus DNA is isolated from the green leaf by the CTAB method (2 Plant Molecular Biology Reporter seven: 1989), 20mers(es) of the structural gene part of a marker gene are made into a primer, and it is PCR (487 239 Science(s), 1988). When tried, DNA which deserves each gene was compounded. From this, existence of the foreign gene in a nucleus genome was checked.

[0029]

[Effect of the Invention] The transformation of the cultured cell of a grass can be performed by using this invention. According to this invention, since it is not necessary to prepare a protoplast, the time amount of a transformation and activities are sharply reducible. moreover -- since the transformation of the monoploid cell is carried out, without it separates into progeny -- installation -- a characteristic transmits. And since there are few differences of the difficulty of the trial between a form and a network, the application to a commercial variety is easy. According to the approach of this invention, since big punching takes place compared with the electroporation method, big DNA and the big matter of molecular weight can be introduced.

---

[Translation done.]

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **05207827 A**

(43) Date of publication of application: **20.08.93**

(51) Int. Cl. **A01H 1/00**  
**C12N 5/10**  
**C12N 13/00**  
**C12N 15/87**

(21) Application number: **03307168**

(22) Date of filing: **28.10.91**

(30) Priority: **01.11.90 JP 40229358**

(71) Applicant: **SAPPORO BREWERIES LTD**

(72) Inventor: **KANEKO TAKASHI**  
**ITO KAZUTOSHI**

**(54) PRODUCTION OF TRANSFORMED PLANT**

**(57) Abstract:**

**PURPOSE:** To remarkably reduce the transforming operation by transducing a genetic substance through holes formed with laser pulses into a pollinical cell in a stage just before starting the division or during the initial division in a process for culturing an anther of the pollinical cell enclosed in the anther of a gramineous plant.

**CONSTITUTION:** In a process for culturing an anther in the mid uninucleate stage microspores enclosed in the anther of a gramineous plant, a genetic substance is transduced through holes formed with laser pulses into the pollinical cell in a stage just before starting the division or during the initial division and the genetic information on the genetic substance is expressed to afford the objective transformed gramineous plant. Furthermore, barley is preferred as the gramineous plant.

**COPYRIGHT:** (C)1993,JPO&Japio



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-207827

(43) 公開日 平成5年(1993)8月20日

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A01H 1/00	A	8502-2B		
C12N 5/10				
13/00		2121-4B		
		7236-4B	C12N 5/00	C
		8931-4B	15/00	A
審査請求 未請求 請求項の数5 (全5頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平3-307168	(71) 出願人	000002196 サッポロビール株式会社 東京都中央区銀座7丁目10番1号
(22) 出願日	平成3年(1991)10月28日	(72) 発明者	金子 隆史 群馬県新田郡新田町木崎37-1 サッポロ ビール株式会社植物工学研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平2-293582	(72) 発明者	伊藤 一敏 群馬県新田郡新田町木崎37-1 サッポロ ビール株式会社植物工学研究所内
(32) 優先日	平2(1990)11月1日	(74) 代理人	弁理士 久保田 藤郎
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 形質転換植物の製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【構成】 イネ科植物の葯に内包される一核期中期の花粉細胞の葯培養過程において、分裂を開始する直前または初期分裂中の段階で、当該花粉細胞にレーザーパルスにより形成された孔を経て遺伝子物質を導入せしめ、当該遺伝子物質の遺伝子情報を発現せしめることを特徴とするイネ科形質転換植物の製造方法並びにイネ科植物の葯に内包される一核期中期の花粉細胞の葯培養過程において、分裂を開始する直前または初期分裂中の段階で、当該花粉細胞に、レーザーパルスにより形成された孔を経て遺伝子物質を導入せしめることを特徴とするイネ科植物形質転換方法。

【効果】 本発明によれば、プロトプラストを調製する必要がないので、形質転換の時間と作業を大幅に削減できる。また、半数体細胞を形質転換するので、後代に分離することなく導入形質が伝達する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 イネ科植物の薬に内包される一核期中期の花粉細胞の薬培養過程において、分裂を開始する直前または初期分裂中の段階で、当該花粉細胞に、レーザーパルスにより形成された孔を経て遺伝子物質を導入せしめ、当該遺伝子物質の遺伝子情報を発現せしめることを特徴とするイネ科形質転換植物の製造方法。

【請求項2】 イネ科植物が、ムギ類である請求項1記載のイネ科形質転換植物の製造方法。

【請求項3】 ムギ類が、オオムギである請求項2記載のイネ科形質転換植物の製造方法。

【請求項4】 イネ科植物の薬に内包される一核期中期の花粉細胞の薬培養過程において、分裂を開始する直前または初期分裂中の段階で、当該花粉細胞に、レーザーパルスにより形成された孔を経て遺伝子物質を導入せしめることを特徴とするイネ科植物形質転換方法。

【請求項5】 イネ科植物の薬に内包される一核期中期の花粉細胞の薬培養過程において、分裂を開始する直前または初期分裂中の段階で、当該花粉細胞に、レーザーパルスにより形成された孔を経て遺伝子物質を導入せしめ、当該遺伝子物質の遺伝子情報を発現する細胞を選択し、この選択された細胞をカルス誘導培地で培養し、カルスおよび／または胚様体を形成せしめ、その後再分化培地に植え継ぎ、植物体を得、形質転換を確認することを特徴とするイネ科形質転換植物の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はイネ科形質転換植物の製造方法およびイネ科植物形質転換方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】 植物の形質転換法として、アグロバクテリウムを利用した遺伝子導入方法が確立されているが、アグロバクテリウムはオオムギを含む禾本科植物には感染することが出来ず、他の方法が試みられている。

【0003】 それらの方法として、ベクターDNAの直接導入の方法が検討されている。例えば、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、ポリエチレングリコール法あるいはマイクロインジェクション法を用いて形質転換する方法、即ちトウモロコシ「Nature, 319 巻, 791(1986)」、イネ「Mol. Gen. Genet., 204 巻, 204(1986)」、ムギ「Mol. Gen. Genet., 199 巻, 178(1985)」および牧草「Mol. Gen. Genet., 199 巻, 178(1985)」で植物細胞への遺伝子導入が可能であることが報告されている。

【0004】 しかし、パーティクルガン法、マイクロインジェクション法といった物理的に遺伝子を細胞に移入する方法では、処理効率の低さやキメラ形質転換植物の発生などの問題がある。

【0005】 さらに、エレクトロポレーションによるイ

ネ科植物への遺伝子導入系を使う形質転換植物の製造法「特開平1-181791号公報」やポリエチレングリコール法などプロトプラストを介する方法が報告されているが、多くのムギ類ではプロトプラストから植物体に至る系が確立されていない。また、プロトプラストの調製に多くの選抜培養と長い期間が必要で、さらにプロトプラスト培養は同一の作物であっても一部の培養特性の優れた品種、系統にしか適用できないのが現状である。

【0006】 レーザーパルスにより形質転換する方法としては現在のところ、動物細胞の形質転換に用いられており、植物組織およびその細胞については予備的な実験への使用に留まり「Weber等、Plant Cell Tissue and Organ Culture, 12巻, 219(1988)」、またオルガネラについての実験「西ドイツ特許出願第3707111A公報」においても使用されているが、上記の方法によって植物の花粉を形質転換することは知られていない。また、トウモロコシ胚へのレーザーによる遺伝子導入系を使う形質転換植物の製造法が報告されている「特開平2-9378号公報」が、この方法により得られる形質転換体はキメラであり、オオムギ等のムギ類でホモ体の形質転換体を得る方法は未だ確立されていない。上述の如く、植物体の形質転換は種々試みられてはいるが、単子葉植物、特にイネ科植物において長らく強い要望があるにも拘らず成し得ていなかった。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は上記課題を克服すべく、鋭意検討を重ねた結果、イネ科植物の花粉に外来遺伝子を効率よく導入し、形質転換されたイネ科植物を製造する方法を見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】 即ち本発明は、イネ科植物の薬に内包される一核期中期の花粉細胞の薬培養過程において、分裂を開始する直前または初期分裂中の段階で、当該花粉細胞にレーザーパルスにより形成された孔を経て遺伝子物質を導入せしめ、当該遺伝子物質の遺伝子情報を発現せしめることを特徴とするイネ科形質転換植物の製造方法並びにイネ科植物の薬に内包される一核期中期の花粉細胞の薬培養過程において、分裂を開始する直前または初期分裂中の段階で、当該花粉細胞にレーザーパルスにより形成された孔を経て遺伝子物質を導入せしめることを特徴とするイネ科植物形質転換方法を提供するものである。以下、本発明を詳細に説明する。

【0009】 本発明の方法は、通常薬に内包される一核期中期の花粉細胞の薬培養過程において、分裂を開始する直前または初期分裂中の段階で、適当な花粉細胞を、導入したい遺伝情報を有する遺伝子物質を含有する溶液、典型的には水溶液中に懸濁させることにより行い得る。次いで、レーザー装置の焦点を当該花粉細胞の一つに合わせ、そしてレーザーを照射して細胞壁中に孔を形成させ、この孔を通じて遺伝子物質を細胞内に導入す

る。この細胞をカルス誘導培地で培養し、カルスおよび／または胚様体を形成せしめ、その後再分化培地に植え継ぎ、形質転換を確認し、形質転換植物を得ることができる。

【0010】イネ科植物の薬をカルス誘導培地で培養し、内包される一核期中期の花粉が培養細胞として分裂を開始する直前または初期分裂中の段階で、適当な花粉細胞を培養する方法は、薬を改変MS培地「Carlsberg Res. Commun. 52巻, 393(1987)」、FHG培地「Kasha 等, XIX Stadler Genetics Symp. 213(1989)」、Clapham, II, III 培地「Z. Pflanzenzucht, 69巻, 142(1973)」、Foroughi-Weir等の培地「Z. Pflanzenzucht, 77巻, 198(1976)」およびそれらの培地の変法培地等の培地より培養する薬の特性に基づいて選定した培地中で培養する。培養温度は、培養する薬によるが、通常22～28℃、好ましくは25℃付近であり、培養時のpHは、通常5.6～6.0、好ましくは5.8であり、培養期間は、培養する薬によるが、通常0～14日間である。レーザー処理は、花粉細胞が分裂し、カルス誘導培地中にDNAを複製する能力を獲得したとき、即ち花粉細胞が形態的に細胞質リッチの細胞に変化したときに実施すべきである。一般に、花粉細胞は2週間以内にレーザー処理に適した細胞に変わる。

【0011】また、Ziauddin等の方法「Plant Cell Reports, 9巻, 59(1990)」により得られた花粉細胞を用いても良い。ここで用いられるイネ科植物は、イネ、トウモロコシ、ムギ類等が挙げられ、ムギ類としては、オオムギ、コムギ、ライムギ、オーツムギ、ライコムギ等が挙げられ、オオムギとしてはDissa, Igri, TRUMPF, CARINA, はるな二条等が挙げられる。これらの植物から常法にしたがって薬を採取すればよい。また、用いられる当該花粉細胞は、薬から単離された一核期中期のものが挙げられる。

【0012】遺伝情報を有する遺伝子物質は、イネ科植物でその遺伝情報を安定化せしめ、その遺伝情報を発現するように制御されたものであり、具体的にはイネ科植物で機能するプラスミドが挙げられ、例えばイネ科植物で機能するプロモーターとしてCaMV35S, CaMV19S等のカリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーター、PR蛋白プロモーター、ADH-1プロモーター等、ターミネーターとしてCaMV35S, CaMV19S, NOS等のターミネーター、形質転換特性として所望の除草剤耐性遺伝子、BT毒素、プロテアーゼインヒビター等の昆虫抵抗性遺伝子、ウイルス抵抗性遺伝子、ゼイン、グルテニン等の貯蔵蛋白遺伝子、Ac, Da等の転移因子遺伝子等の外来遺伝子等を有する。さらに、初期選択マーカーとして薬剤耐性遺伝子を有してもよい。

【0013】当該遺伝子物質を含有する溶液は、細胞中に導入することを希望する遺伝子約10～20,000μ

g/mlと他成分、具体的には正確な浸透圧の平衡化または高強化を促進するための不活性塩類、細胞栄養物または他の添加剤を有するものである。より具体的に例示すると、9～15%のマンニトールを含有する遺伝子懸濁液を挙げることができる。

【0014】次に、レーザー装置の焦点を当該花粉細胞の一つに合わせ、そしてレーザーを照射して細胞壁中に孔を形成させ、この孔を通じて遺伝子物質を細胞内に導入するわけであるが、孔の寸法は変動させ得るが、細胞の寸法と比較して余り大きいものであってはならない。具体的には通常5～500nmの直径を有する孔を形成せしめる。パルス印加時間は通常5～20ナノ秒であり、好ましくは10～15ナノ秒である。パルスエネルギーは、通常0.1～10マイクロジュール(μJ)の範囲に調整する。用いられるレーザー装置は、原則的には適度に微小な焦点にレーザーを集中することができる任意の装置を使用しうる。好適には、既に哺乳動物細胞のレーザーマイクロインジェクションに利用可能な装置として市販されている日立製作所製の日立レーザーセルプロセッサが挙げられる。

【0015】レーザー処理を行った後、遺伝子物質をその溶液から穿孔後の花粉細胞中に拡散、侵入させるのに十分な時間、当該花粉細胞を当該遺伝子物質を含有する溶液中で、インキュベートする。インキュベート時間は、通常5秒～2時間であり、インキュベーションの温度は、通常0～28℃である。

【0016】上述の如くして行われたレーザー処理とインキュベーションを行った後、得られた花粉細胞またはこれから誘導された細胞を培養して植物体を生ぜしめる。本発明の好ましい態様として、Olsen等の方法「Carlsberg Res. Commun. 52巻, 393(1987)」、Ziauddin等の方法「Plant Cell Reports, 9巻, 59(1990)」が挙げられる。さらに、好ましい態様としてナース細胞の利用を挙げることができる。

【0017】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を説明するが、これらは何等本発明を限定するものではない。

#### 実施例1

オオムギ cv Dissa 播種後、12℃-明-16時間、10℃-暗-8時間で生育せしめ、花粉一核期中期(mid unucleate stage microspores)の薬を改変MS+Ficoll培地に植え付け、25度-2週間培養後、ピンセット及び薬匙で薬を裂開し、花粉細胞をDNA溶液中に流しだす。10～20個の薬を1ml溶液に取り、96μmφナイロンメッシュでカルスと夾雑物を除いて分裂を開始する直前の培養細胞を遠心分離(1000rpm×5min)で20～100μlに濃縮回収し、レーザー処理サンプルとする。

【0018】用いるDNA溶液はOkada 溶液+15%マンニトール+pBI221〔東洋紡績株式会社販売〕10μg/

ml+pSBG102(Hm<sup>r</sup>) [上記pBI221のBamHI, PstI サイトに囲まれたβ-グルクロニダーゼ構造遺伝子をハイグロマイシンBフォスフォトランスフェラーゼ構造遺伝子「Gene, 25巻, 179(1983)」に置き換えたもの] 10 μg/ml+Calf Thymus DNA 50 μg/mlである。

【0019】シャーレ上にこの液滴を置き、乾燥を防ぐために5mm角の1%アガロース片をのせ、シャーレに蓋をしてフィルムで巻き、日立レーザー セル プロセッサにセットした。このサンプルは花粉細胞、発生した単細胞および分裂を開始した細胞塊を含有している。細胞質リッチの発生単細胞を選び、0.4 μJ のエネルギーでレーザーパルス穿孔した。

5mg X-glu in deoxydized DMF(dimethyl formamide)



solute in 5ml 50mM K.P.buffer (カリウムリン酸バッファー) [pH7.0 終濃度1mg/ml]

#### 【0022】GUS溶解バッファー

50mM K.P. buf pH7.0+10mM EDTA+0.1%Triton X 100+0.1% Sarkosyl +10mM 2-Mercaptoethanol

#### 【0023】細胞の調製

小さいコロニーや組織の表面を染色する場合は、そのまま液に浸せばよい。反応を定量的に、または正確に行わせる場合は、組織に少量のGUS溶解バッファーを加えて摺り潰し、基質を加える。1mmカルスではGUS溶解バッファー20 μl, X-glu溶液100 μlでよい。

#### 【0024】実施例2

オオムギIgr i播種後、12℃-明-16時間、10℃-暗-8時間で生育させ、花粉一核期中期(mid unincleate stage microspores) の薬を得た。次いで、この薬を改変MS+Ficol培地に植え付け、25℃で2週間培養後、ピンセット及び葉庭で薬を裂開し、花粉細胞をDNA溶液中に流しだす。10~20個の薬を1ml溶液に取り、96 μmφナイロンメッシュでカルスと夾雑物を除いて初期分裂中の培養細胞を遠心分離(1000rpm×5min)で20~100 μlに濃縮回収し、レーザー パルス処理サンプルとした。

【0025】用いるDNA溶液はOkada 溶液+15%マンニトール+pBI221 [東洋紡績株式会社販売] 10 μg/ml+pSBG102(Hm<sup>r</sup>) [上記pBI221のBamHI, PstI サイトに囲まれたβ-グルクロニダーゼ構造遺伝子をハイグロマイシンBフォスフォトランスフェラーゼ構造遺伝子「Gene, 25巻, 179(1983)」に置き換えたもの] 10 μg/ml+Calf Thymus DNA 50 μg/mlである。

【0026】シャーレ上にこの液滴を置き、乾燥を防ぐために5mm角の1%アガロース片をのせ、シャーレに蓋をしてフィルムで巻き、日立レーザー セル プロセッサにセットした。このサンプルを、0.4 μJ のエネルギー

【0020】処理後のサンプルは、100~200 μlの改変MS液体培地で希釈し、25℃で静置培養した。2週間後に等量の培地(ハイグロマイシンB含有)を加えた。数ミリ径のカルスになったものについてGUS酵素の導入形質を調査した。その結果、約1/16の割合でGUS活性が認められた。以下にGUS活性の測定方法を示す。

#### 【0021】GUSアッセイの方法

ガス分析用染色液の処方

X-glu溶液(5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロン酸) 貯蔵溶媒

[20mg/1 X-gluDMF]

ギーで自動的にレーザー穿孔する。

【0027】処理後のサンプルは、500 μlの改変MS液体培地で希釈し、25℃で静置培養した。2週間後に等量のハイグロマイシン選抜培地(20 μg/mlハイグロマイシンB)を加えた。数ミリ径のカルスになったものについてGUS酵素またはハイグロマイシン耐性などの導入形質を調査した。その結果、処理細胞の約1/2000の割合でハイグロマイシン耐性が認められた。

#### 【0028】植物体への再分化

オオムギ形質転換植物の再分化

子葉に相当する葉原基を、ホルモンを除いた発根培地に移植して、同条件で培養することにより根の発達と地上部の生育を促し、ほぼ1ヶ月で完全な植物体が再分化した。その生葉よりCTAB法(Plant Molecular Biology Reporter 7:2, 1989)で核DNAを単離し、マーカ遺伝子の構造遺伝子部分の20mersをプライマーにして、PCR(Science 239巻, 487, 1988)を試みたところ、各々の遺伝子に値するDNAが合成された。このことから、核ゲノム中の外来遺伝子の存在が確認された。

#### 【0029】

【発明の効果】本発明を用いることにより、イネ科植物の培養細胞の形質転換を行うことができる。本発明によれば、プロトプラストを調製する必要がないので、形質転換の時間と作業を大幅に削減できる。また、半数体細胞を形質転換するので、後代に分離することなく導入形質が伝達する。しかも、品種、系統間の試験の難易度の差が少ないので、実用品種への応用が容易である。本発明の方法によれば、エレクトロポレーション法に比べて大きな穿孔が起こるので、分子量の大きなDNAや物質が導入できる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>

C 1 2 N 15/87

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所